



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 600 372 A1**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **93118993.0**

51 Int. Cl.5: **C07K 7/40, C07K 17/08,  
//A61K37/26, C07K99/26**

22 Anmeldetag: **25.11.93**

30 Priorität: **02.12.92 DE 4240420**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**08.06.94 Patentblatt 94/23**

94 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE**

71 Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Brüningstrasse 50  
D-65929 Frankfurt am Main(DE)**

72 Erfinder: **Obermeler, Rainer, Dr.  
Eppsteiner Strasse 2c  
D-65795 Hattersheim am Main(DE)  
Erfinder: Gerl, Martin, Dr.  
Hasenpfad 3  
D-65830 Kriftel/Ts.(DE)  
Erfinder: Ludwig, Jürgen  
Ringstrasse 13  
D-63636 Brachtal(DE)  
Erfinder: Sabel, Walter  
Neugasse 4c  
D-65520 Bad Camberg(DE)**

54 **Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin mit korrekt verbundenen Cystinbrücken.**

57 Es wird ein Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin mit korrekt verbundenen Cystinbrücken aus einer entsprechenden Proinsulinamino-säurekette in Anwesenheit von Mercaptan, chaotropen Hilfsstoffen und einem pH-Wert von 10 bis 11 beschrieben, sowie seine direkte Isolierung aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe hydrophober Adsorberharze.

EP 0 600 372 A1

Humaninsulin ist ein Protein mit zwei Aminosäureketten mit zusammen 51 Aminosäureresten. In den beiden Aminosäureketten kommen 6 Cysteinreste vor, wobei je zwei Cysteinreste über eine Disulfidbrücke untereinander verbunden sind. In biologisch aktivem Humaninsulin sind die A- und B-Ketten über zwei Cystinbrücken miteinander verbunden, und eine weitere Cystinbrücke kommt in der A-Kette vor. Innerhalb eines Humaninsulinmoleküls gibt es statistisch gesehen 15 Möglichkeiten zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Im biologisch wirksamen Humaninsulin kommt nur eine der 15 Möglichkeiten vor. Die folgenden Cysteinreste sind im Humaninsulin miteinander verknüpft:

A 6 - A 11

A 7 - B 7

A 20 - B 19

Die Buchstaben A oder B stehen für die jeweiligen Insulinketten, die Zahl für die Position des Aminosäurerestes, die vom Amino- zum Carboxylende der jeweiligen Aminosäurekette gezählt wird. Disulfidbrücken können auch zwischen zwei Humaninsulinmolekülen ausgebildet werden, so daß leicht unübersehbar viele verschiedene Disulfidbrücken entstehen können.

Ein bekanntes Verfahren zur Herstellung von Humaninsulin beruht auf der Verwendung von humanen Proinsulin. Humanes Proinsulin ist ein Protein mit einer linearen Aminosäurekette aus 86 Aminosäureresten, wobei die A- und B-Ketten des Humaninsulins über ein C-Peptid mit 35 Aminosäureresten miteinander verbunden sind. Die Ausbildung der in Humaninsulin vorkommenden Disulfidbrücken erfolgt über ein Zwischenprodukt, wobei die Cysteinreste des Humaninsulins mit einer Schwefelschutzgruppe, z.B. einer S-Sulfonat ( $-S-SO_3^-$ )-Gruppe versehen sind (EP 0 037 255). Ferner ist ein Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin mit korrekt verbundenen Cystinbrücken bekannt (Biochemistry, 60, (1968), Seiten 622 bis 629), das von Proinsulin aus Schweinen ausgeht, bei dem die Cysteinreste als Thioester (-SH) vorliegen. Unter dem Begriff "korrekt verbundenen Cystinbrücken" versteht man die Disulfidbrücken, die in biologisch aktiven Insulin aus Säugetieren vorkommen.

Gentechnische Verfahren erlauben es, menschliches Proinsulin oder Proinsulin, das eine von Humaninsulin abweichende Aminosäuresequenz und/oder Aminosäurekettenlänge hat, in Mikroorganismen herzustellen. Die von gentechnisch veränderten Escherichia coli-Zellen hergestellten Proinsuline haben keine korrekt verbundenen Cystinbrücken. Ein Verfahren zur Gewinnung von Humaninsulin mit E. coli (EP 0 055 945) beruht auf folgenden Verfahrensschritten:

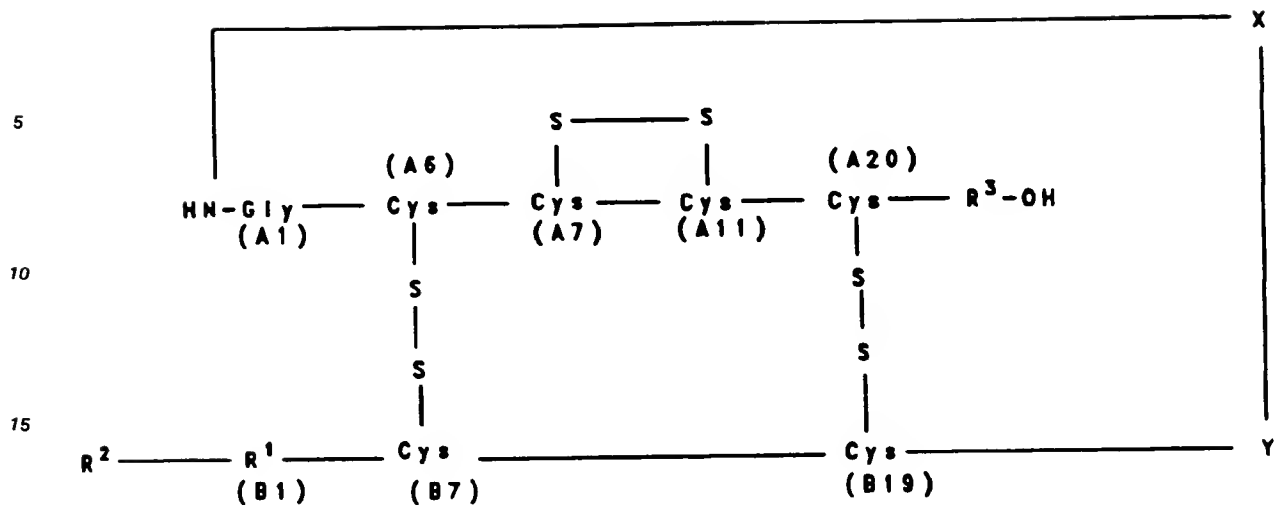
Fermentation der Mikroorganismen - Zellaufschluß - Isolierung des Fusionproteins - Bromcyanspaltung des Fusionproteins - Isolierung des Spaltprodukts mit der Proinsulinsequenz - Schutz der Cysteinreste von Proinsulin durch S - Sulfonat-Gruppen - Ausbildung der korrekt verbundenen Cystinbrücken - Sulfitolys - Entsalzen des Proinsulins - Chromatographische Reinigung des Proinsulins mit korrekt verbundenen Cystinbrücken - Konzentrierung der Proinsulinlösung - Chromatographische Reinigung der konzentrierten Proinsulinlösung - Enzymatische Spaltung des Proinsulins zur Gewinnung von Humaninsulin - Chromatographische Reinigung des entstandenen Humaninsulins.

Nachteile dieses Verfahrens sind die Anzahl der Verfahrensschritte und die Verluste bei den Reinigungsschritten, die zu einer geringen Ausbeute an Insulin führen. Wegen des vielstufigen Verfahrensweges müssen erhebliche Verluste bei dieser Verfahrensweise in Kauf genommen werden. Von der Stufe des isolierten Fusionproteins über Bromcyanspaltung, Sulfitolys und Reinigung des Proinsulins muß mit einem bis zu 40%igem Verlust von Proinsulin gerechnet werden (EP 0 055 945). Ähnlich hohe Verluste können im Verlauf der nachfolgenden Reinigungsschritte bis zum Endprodukt auftreten.

Ausbeutesteigerungen bei der gentechnischen Herstellung von Humaninsulin oder Insulinderivaten lassen sich dann erzielen, wenn die Zahl der notwendigen Verfahrensschritte wesentlich verringert werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin mit korrekt verbundenen Cystinbrücken der Proinsulinaminosäurekette zu entwickeln, bei dem weniger Verfahrensschritte nötig sind und insgesamt geringere Reinigungsverluste auftreten.

Es wurde nun ein Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin der Formel I



20 gefunden,  
das dadurch gekennzeichnet ist, daß man  
A) ein Protein der Formel II,



25 mit einer Menge eines Mercaptans, die 2 bis 10 Reste -SH des Mercaptans pro Cysteinrest des Proteins der Formel II ergibt, in Gegenwart von einem chaotropen Hilfsstoff in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 10 bis 11 und einer Konzentration des Proteins der Formel II von 0,05 bis 0,3 g pro Liter wäßrigen Mediums umsetzt und das erhaltene Proinsulin der Formel I

30 B) mit 3 bis 50 g eines hydrophoben Adsorberharzes pro Liter wässrigen Mediums bei einem pH-Wert von 4 bis 7 versetzt,

C) das Adsorberharz mit adsorbiertem Proinsulin der Formel I isoliert und

D) das Proinsulin der Formel I vom Adsorberharz desorbiert;

dabei ist in Formel I und II

35	X	a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten,
	Y	ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest,
	R <sup>1</sup>	ein Phenylalaninrest oder eine kovalente Bindung,

40 R<sup>2</sup>

- a) ein Wasserstoffatom,
- b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder
- c) ein Peptid mit 2 bis 45 Aminosäureresten,

45 **R<sup>3</sup>** ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest und  
die Reste **A2 - A20** entsprechen der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin, tierischem Insulin  
oder einem Insulinderivat und die Reste **B2 - B 29** entsprechen der Aminosäuresequenz der B-Kette von  
Humaninsulin, tierischem Insulin oder einem Insulinderivat.

Bevorzugt sind Proteine der Formel II; dabei ist

50 X ein Peptid mit der Aminosäuresequenz der C-Kette von Humaninsulin,  
Y ein Aminosäurerest aus der Gruppe Ala, Thr oder Ser,  
R<sup>1</sup> der Aminosäurerest Phe,  
R<sup>2</sup>

55 R<sup>3</sup> a) Wasserstoffatom oder  
b) ein Peptid mit 2 bis 25 Aminosäureresten,  
ein Aminosäurerest aus der Gruppe Asn, Ser oder Gly,

und die Reste A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

Besonders bevorzugt sind Proteine der Formel II; dabei ist

X ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäurereste, wobei am Anfang und Ende des Peptids zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

Y der Aminosäurerest Thr,

R<sup>1</sup> der Aminosäurerest Phe,

R<sup>2</sup>

a) Wasserstoffatom oder

b) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten, an dessen Carboxylende der Aminosäurerest Met oder Arg steht,

R<sup>3</sup> der Aminosäurerest Asn,

und die Reste A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß das Protein der Formel II nicht in einem üblicherweise dem "Refolding" vorausgehenden Reaktionsschritt vollständig reduziert werden muß (R. Jaenicke, R. Rudolph, 1989, Folding Proteins, in Protein Structure a practical Approach; ed. Creighton, T.E. S 191-224, JRL Press Oxford; EP 0 219 874) und daß bei der beschriebenen Verfahrensweise trotz eines hohen Anteils von Fremdprotein (70 - 90 %) Faltungsausbeuten erzielt werden, die in vergleichbarer Höhe liegen wie bei der Faltung von entsprechend gereinigtem Proinsulin mit -SH-Schutzgruppen.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt, verglichen mit den bisher bekannten Methoden, eine wesentlich schnellere Herstellung mit höheren Ausbeuten. Ursache dafür ist die Vermeidung der Verfahrensschritte Sulfitolyse und gegebenenfalls Bromcyanspaltung sowie die bisher unbekannte Möglichkeit, Proinsulin entsprechend der Formel (I) direkt aus ihrem denaturierten Zustand in Gegenwart begrenzter Mengen von chaotropen Salzen in hohen Ausbeuten in die biologisch aktive Struktur zu falten. Dadurch wird es möglich, das entstandene Proinsulin durch Adsorption aus der Faltungslösung abzutrennen. So können die Proinsuline ohne Zwischenisolierung oder Reinigung nach Desorption vom Adsorptionsmittel der enzymatischen Konversion zu Insulin zugeführt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu einem erheblich verkürzten Herstellungsverfahren, das wegen kürzerer Standzeiten und Vermeidung von Verlusten Ausbeuteerhöhungen in Höhe von 25-100 % gegenüber den bekannten Verfahren ermöglicht.

Die Aminosäuresequenz von Peptiden und Proteinen wird vom N-terminalen Ende der Aminosäurekette an bezeichnet. Die in Formel I in Klammern gemachten Angaben, z.B. A6, A20, B1, B7 oder B19, entsprechen der Position von Aminosäureresten in den A- oder B-Ketten des Insulins.

Für den Begriff "genetisch kodierbarer Aminosäurerest" stehen die Aminosäuren

**Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, His, Tyr, Phe, Trp, Pro**

und Selenocystein.

Für die Begriffe "Reste A2 - A20" und "Reste B2 - B 29" von tierischen Insulin werden beispielsweise die Aminosäuresequenzen von Insulin aus Rindern, Schweinen oder Hühnern verstanden.

Der Begriff Reste A2 - A20 und B2 - B29 von Insulinderivaten steht für die entsprechenden Aminosäuresequenzen von Humaninsulin, die durch den Austausch von Aminosäuren durch andere genetisch kodierbare Aminosäuren gebildet werden.

Die A-Kette von Humaninsulin hat folgende Sequenz (Seq Id No. 1):

**Gly, Ile, Val, Glu, Gln, Cys, Cys, Thr, Ser, Ile, Cys, Ser, Leu,  
Tyr, Gln, Leu, Glu, Asn, Tyr, Cys, Asn**

Die B-Kette von Humaninsulin hat folgende Sequenz (Seq Id No. 2):

Phe, Val, Asn, Gln, His, Leu, Cys, Gly, Ser, His, Leu, Val, Glu,  
 Ala, Leu, Tyr, Leu, Val, Cys, Gly, Glu, Arg, Gly, Phe, Phe, Tyr,  
 Thr, Pro, Lys, Thr

Die C-Kette von Humaninsulin hat folgende Sequenz (Seq Id No. 3).

Arg, Arg, Glu, Ala, Glu, Asp, Leu, Gln, Val, Gly, Gln, Val, Glu, Leu, Gly, Gly,  
 Gly, Pro, Gly, Ala, Gly, Ser, Leu, Gln, Pro, Leu, Ala, Leu, Glu, Gly, Ser, Leu,  
 Gln, Lys, Arg.

Chaotrope Hilfsmittel sind Verbindungen, die in wäßriger Lösung Wasserstoffbrückenbindungen brechen, beispielsweise Ammoniumsulfat, Guanidinhydrochlorid, Ethylencarbonat, Thiocyanat, Dimethylsulfoxid und Harnstoff.

Der Begriff hydrophobes Adsorberharz steht für nicht ionische, hydrophobe, vernetzte Polymere und/oder Copolymere, beispielsweise Polystyrol oder Copolymere aus Styrol und Divinylbenzol, insbesondere polymere Adsorberharze mit großer Oberfläche und vielen großen Poren, z.B. Handelspräparate der Firmen Rohm and Haas oder Mitsubishi Chemical Industries Ltd. wie XAD16, XAD1600 oder HP20.

Unter dem Begriff Mercaptan werden Verbindungen verstanden, die wasserlöslich sind und wenigstens eine -SH-Gruppe enthalten. Beispiele für diese Verbindungen sind Dithiothreitol, Dithioerythrol, 2-Mercaptoethanol, Cystein, Methylthioglykolat, 3-Mercapto-1,2-propandiol und 3-Mercaptopropionsäure.

Das Protein der Formel II kann mit Hilfe einer Vielzahl gentechnischer Konstrukte in Mikroorganismen gebildet werden (EP 0 489 780, EP 0 347 781, EP 0 453 969). Die gentechnischen Konstrukte werden in Mikroorganismen wie Escherichia coli oder Streptomyces während der Fermentation exprimiert. Die gebildeten Proteine werden im Inneren der Mikroorganismen abgelagert (EP 0 489 780) oder in die Fermentationslösung ausgeschieden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren können Proteine der Formel II eingesetzt werden, die direkt nach dem Zellaufschluß noch mit einer Vielzahl von Proteinen, die aus der Fermentationslösung und aus den Mikroorganismen stammen, verunreinigt sind. Die Proteine der Formel II können aber auch in vorgereinigter Form beispielsweise nach einer Fällung oder einer chromatographischen Reinigung eingesetzt werden.

Beim Verfahrensschritt A) geht man wie folgt vor:

Die Proteine werden in einem chaotropen Hilfsmittel oder in Mischungen von verschiedenen chaotropen Hilfsmitteln gelöst. Bevorzugt wird Guanidinhydrochlorid in einer Konzentration von 6 bis 10 M, bevorzugt 8 M, bezogen auf Wasser als Lösungsmittel, verwendet. Der pH-Wert des Reaktionsgemischs beträgt 8,5 bis 10,8. Beispiele für brauchbare Puffer sind Phosphat-, Tri(hydroxymethyl)aminomethan(Tris)-, Borat- oder Glycinpuffer. Die Konzentration der Puffersubstanzen im wäßrigem Medium beträgt bis zu 0,5 M, bevorzugt von 0,005 M bis 0,5 M, besonders bevorzugt von 0,05 bis 0,1 M. Anschließend wird die Proteinmischung mit einer wäßrigen Mercaptanlösung gemischt. Dadurch werden folgende Konzentrationen in der Reaktionslösung (bezogen auf Wasser) eingestellt:

Die Konzentration des Proteins der Formel II beträgt 0,05 bis 0,3 g/l, bevorzugt 0,1 bis 0,2 g/l.

Die Menge des Mercaptans beträgt 2 bis 10 Reste -SH des Mercaptans pro Cysteinrest des Proteins der Formel II, bevorzugt 3 bis 6.

Der pH-Wert der Lösung beträgt 10 bis 11, bevorzugt 10,8. Es werden die obengenannten Pufferkomponenten verwendet. Der genaue pH-Wert wird durch Zugabe von Natronlauge eingestellt. Die Konzentration der Pufferkomponenten beträgt 0,005 bis 0,5 M, bevorzugt 0,05 bis 0,1 M.

Die Konzentration des chaotropen Hilfsmittels im Reaktionsansatz mit dem Mercaptan beträgt weniger als 1 M, bevorzugt 0,1 bis 0,8 M, insbesondere 0,3 bis 0,6 M. Als Mercaptan wird bevorzugt Cystein oder 2-Mercaptoethanol allein oder als Mischung eingesetzt.

Die Temperatur während der Faltung im Verfahrensschritt A) beträgt 0 °C bis 50 °C, vorzugsweise 2 °C bis 30 °C, insbesondere 4 °C bis 10 °C. Die Reaktionszeit beträgt 3 bis 12 Stunden, bevorzugt 4 bis 8 Stunden, insbesondere 5 Stunden.

Das Ergebnis von Verfahrensschritt A) ist ein Proinsulin der Formel I, welches korrekt verbundene Cystinbrücken enthält.

Bei Verfahrensschritt B) wird die Reaktionslösung aus Verfahrensschritt A) mit einer Säure wie Salzsäure oder Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 4 bis 7 eingestellt. Wenn es zu Trübungen der Lösung kommen sollte, werden diese durch Filtration oder Zentrifugation entfernt. Die verbliebene Lösung wird mit einem hydrophoben Adsorberharz versetzt. Als günstig haben sich Harze vom Typ des XAD oder HP20 bewährt. Die Menge des Harzes beträgt 3 bis 50 g pro Liter Reaktionslösung, bevorzugt 10 bis 25 g/l.

Die erhaltene Suspension wird 3 bis 4 Stunden gerührt. Die Adsorption des Proinsulins der Formel I an das Harz wird durch Probennahme und Hochdruckflüssigchromatographie-Analyse (HPLC-Analyse) kontrolliert. Sobald kein Proinsulin mehr in der Lösung nachweisbar ist, wird das Adsorberharz von der wäßrigen Reaktionslösung abgetrennt (Verfahrensschritt C). Dies erfolgt beispielsweise durch Filtration oder Zentrifugation nach bekannten Methoden. Das Harz mit adsorbiertem Proinsulin wird mit einer rein wäßrigen oder pufferhaltigen wäßrigen Lösung gewaschen.

Die Desorption (Verfahrensschritt D) des Proinsulins der Formel I erfolgt nach bekannten Methoden, die vom verwendeten hydrophoben Adsorberharz abhängen. Die Desorption erfolgt bei XAD- oder HP20-Adsorberharzen beispielsweise durch eine wäßrige Lösung, die 10 bis 50 % eines mit Wasser mischbaren, nichtionischen organischen Lösungsmittels, z.B. ein (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkanol, enthält. Bevorzugt wird 50 % Isopropanol im Lösungsmittel Wasser verwendet. Die Desorption des Proinsulins der Formel I erfolgt beispielsweise durch Waschen mit der Isopropanollösung. Das Waschen kann in einem Rührkessel durch Mischen mit der Isopropanollösung erfolgen oder durch Chromatographie in einer Säule. Das Volumenverhältnis Harz zu Isopropanollösung beträgt 1:1 bis 1:10 bevorzugt 1:1,1 bis 1:2. Die Waschschrte können ein- bis fünfmal wiederholt werden, bevorzugt zweimal. Die vereinigten Isopropanolfractionen können direkt oder nach Verdünnung mit Wasser für weitere Chromatographiereinigungen oder für die enzymatische Spaltung des Proinsulins zu Insulin verwendet werden (Kemmler et al., J. Biol. Chem. 246 (1971) Seite 6786; EP 0 305 760).

In den folgenden Beispielen wird das erfindungsgemäße Verfahren im einzelnen beschrieben. Prozentangaben beziehen sich auf das Gewicht, sofern nicht anders angegeben.

#### Beispiel 1

Durch Fermentation von genetisch modifizierten Escherichia-coli-Zellen (EP 0 489 780) wird Proinsulin 1 mit folgender Aminosäuresequenz hergestellt. Proinsulin 1 (Seq Id No. 4):

**Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His  
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu  
Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
Asn**

Proinsulin 1 entspricht der Formel II, dabei ist

X C-Peptid von Humaninsulin,

Y Thr (B30),

R<sup>1</sup> Phe (B1),

R<sup>2</sup> ein Peptid mit 11 Aminosäureresten,

R<sup>3</sup> Asn (A21) und

A2 - A20 die Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin (Aminosäurereste 2 bis 20) und B2 - B29 die Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin (Aminosäurereste 2 bis 29).

In den E.-coli-Zellen sammelt sich das exprimierte Proinsulin 1 und bildet Einschlusskörper. Nach Beendigung der Fermentation werden die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt und durch übliche Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Die freigesetzten Fusionsproteineinschlusskörperchen werden durch Zentrifugation isoliert.

1000 g der isolierten Fusionsproteineinschlußkörper (bezogen auf Trockenmasse nach Gefriertrocknung) des Proinsulins werden in 100 l einer 8 M Guanidinhydrochlorid-Lösung bei pH 10,8 gelöst. Nach Zentrifugation geringer Mengen Trübstoffe wird die klare Lösung in 900 l einer wäßrigen Cysteinlösung (125 g Cysteinhydrochloridhydrat) bei einem pH-Wert von 10,8 und einer Temperatur von 4 °C eingebracht.

Der Anteil des insulinhaltigen Fusionsproteins wird mit Hilfe von SDS-Elektrophorese-Scan (U.K. Lämli, Nature, Band 227, Seiten 680-685, 1970) bestimmt. Er beträgt 15 %.

Nach Abschluß der Faltungsreaktion wird mit Hilfe der analytischen HPLC ein Proinsulin-Gehalt im Reaktionsansatz von 105 g gemessen.

Die Lösung wird mit 6 N HCl auf einen pH von 4,5 eingestellt und eine leichte Trübung durch Zentrifugation entfernt. Zur klaren Lösung werden 30 kg von HP20 (Mitsubishi Chemical Industries Ltd., Düsseldorf, Deutschland) gegeben. Die Suspension wird etwa 4 Stunden langsam gerührt, bis kein Proinsulin 1 mehr im Überstand nachzuweisen ist. Durch Filtration über eine Nutsche wird das Harz abgetrennt und mit Wasser gewaschen. Die Desorption des Produktes erfolgt durch Aufschlämmung des Harzes in 50 l 50%iger, wäßriger Isopropanollösung. Filtration und Inkubation mit der Isopropanollösung wird zweimal wiederholt.

Die Ausbeute an Proinsulin der Formel I beträgt 103 g.

#### HPLC-Analyse

0,5 g Protein werden in 40 ml einer Lösung aus 6 M Guanidinhydrochlorid, 50 mM Tris, pH 8,5, 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 % 2-Mercaptoethanol, 10 mM Dithiothreitol bei 95 °C für 2 min gelöst und dann bei 14000 g für 20 min zentrifugiert. Von dem klaren Überstand werden 0,02 ml auf eine Hochdruckflüssigchromatographiesäule aufgetragen.

Säule: Nucleogel RP 300-5/46 (Macherey & Nagel, Aachen, Deutschland)

Gradient: Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)

Puffer B: 0,09 % TFA in Acetonitril

Temperatur: 55 °C

Gesamtlaufzeit: 15 min,

Der Gradient ist gekennzeichnet durch die folgende Mengen von Puffer B nach den entsprechenden Laufzeiten :

10 min 25%, 12 min 60 %, 13 min 90 %, 15 min 100 %.

Fluß: 1 ml/min

Detektion: 215 nm

Retentionszeit von Proinsulin: 9 min.

#### Beispiel 2

Durch Fermentation von einem genetisch modifizierten E. coli (EP 0 347 781) wird ein Proinsulin 2 mit folgender Aminosäuresequenz hergestellt: Proinsulin 2 (Seq Id No.: 5)

**Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu  
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr  
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Ile Glu Gly Arg Phe Val Asn Gln  
His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly  
Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln  
Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn**

In den E.-coli-Zellen sammelt sich das exprimierte Proinsulin 2 und bildet häufig Einschlußkörper. Der Aufschluß der Zellen erfolgt wie in Beispiel 1. Die so erhaltenen Proinsuline werden einer Bromcyanspaltung unterworfen und es entsteht Proinsulin 3 (Seq Id No. 7).

Proinsulin 3 entspricht der Formel II, dabei ist

X Arg,

Y Thr (B30),

R' Phe (B1),

R<sup>2</sup> ein Peptid mit 4 Aminosäureresten,  
R<sup>3</sup> Asn (A21) und

A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

Nach der Bromcyanspaltung wird der Gehalt an Proinsulin 3 mit Hilfe der SDS-Elektrophorese in einer gefriergetrockneten Probe mit 9,2 % insulinhaltiges Protein quantitativ bestimmt.

1000 g des Proinsulin 3 werden wie im Beispiel 1 mit Cysteinhydrochloridhydrat inkubiert. Danach wird mittels analytische HPLC ein Gehalt von 63 g an Proinsulin der Formel I in dem gesamten Reaktionsansatz bestimmt. Wie in Beispiel 1 wird das Produkt mit 35 kg XAD-1600 Harz (Rohm and Haas Company, Philadelphia, USA) adsorbiert und aus der Reaktionslösung entfernt. Nach Waschen des Harzes und Desorption des Produktes wird der Gehalt an Proinsulin der Formel I mit 56 g bestimmt.

### Beispiel 3

Durch Fermentation von einem gentechnisch modifizierten E. coli (EP 0 489 780) wird Proinsulin 4 mit folgender Aminosäuresequenz hergestellt: Proinsulin 4 (Seq Id No: 6)

**Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His  
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys**

**Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn**

Proinsulin 4 entspricht der Formel II, dabei ist

X Arg,  
Y Thr, (B30),  
R<sup>1</sup> Phe (B1),  
R<sup>2</sup> ein Peptid mit 11 Aminosäuren,  
R<sup>3</sup> Asn (A21) und

A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

Nach Aufschluß der Zellen wird aus dem Homogenisat das Fusionsprotein durch Zentrifugation gewonnen. Davon werden nach Bestimmung des Produktgehaltes (15 %) wie in Beispiel 1 1000 g zur Faltungsreaktion eingesetzt. Die Faltungsausbeute am Ende der Reaktion wird wie in Beispiel 1 mit 60 % bestimmt. Die Ausbeute beträgt 108 g Proinsulin.



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
- (B) STRASSE: -
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: -
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 65926
- (G) TELEPHON: 069-305-6047
- (H) TELEFAX: 069-357175
- (I) TELEX: 41234-700 hod

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin mit korrekt verbundenen Cystinbruecken

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)
- (E) ANMELDE-NR.: (V) (A) EP 93 118 993.0

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu
1				5					10					15	
Glu Asn Tyr Cys Asn															
20															

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
1 5 10 15  
Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
20 25 30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
(B) LAGE: 1..35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly  
1 5 10 15  
Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu  
20 25 30  
Gln Lys Arg  
35

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 97 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
(B) LAGE: 1..97

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His  
1 5 10 15  
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
20 25 30  
Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu  
35 40 45  
Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
50 55 60  
Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
65 70 75 80

Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
85 90 95

A87

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 96 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
  - (B) LAGE: 1..96

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
1				5					10					15	
His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
			20					25					30		
Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Ile	Glu	Gly	Arg	Phe	Val	Asn	Gln
		35					40					45			
His	Leu	Cys	Gly	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Cys	Gly
	50					55					60				
Glu	Arg	Gly	Phe	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Thr	Arg	Gly	Ile	Val	Glu	Gln
65					70					75					80
Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Ser	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn
				85					90					95	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 63 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Escherichia coli
- (ix) MERKMALE:
  - (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
  - (B) LÄGE: 1..63

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Asn Gln His  
1 5 10 15  
Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys  
35 40 45

Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
50 55 60

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 56 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Escherichia coli

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LÄNGE: 1..56

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Ile Glu Gly Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val  
1 5 10 15

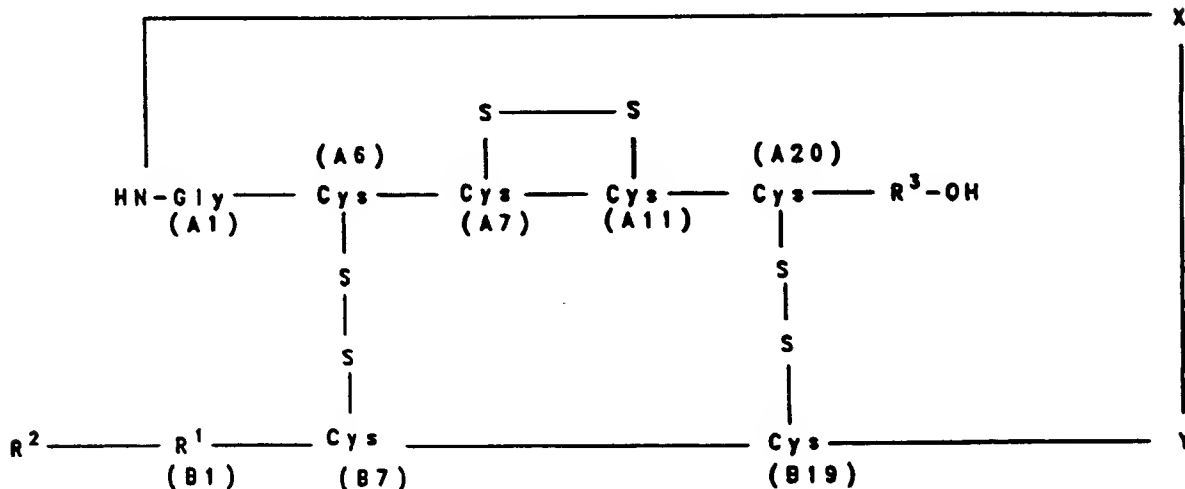
Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro  
20 25 30

Lys Thr Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu  
35 40 45

Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
50 55

Patentansprüche

1. Verfahren zur Gewinnung von Proinsulin der Formel I



dadurch gekennzeichnet, daß man  
A) ein Protein der Formel II,

R<sup>2</sup>-R<sup>1</sup>-B2-B29-Y-X-Gly-A2-A20-R<sup>3</sup> (II)

mit einer Menge eines Mercaptans, die 2 bis 10 Reste -SH des Mercaptans pro Cysteinrest des Proteins der Formel II ergibt, in Gegenwart von mindestens einem chaotropen Hilfsstoff in einem wäßrigen Medium bei einem pH-Wert von 10 bis 11 und einer Konzentration des Proteins der Formel II von 0,05 bis 0,3 g pro Liter wäßrigen Mediums umgesetzt und das erhaltene Proinsulin der Formel I

B) mit 3 bis 50 g eines hydrophoben Adsorberharzes pro Liter wäßrigen Mediums bei einem pH-Wert von 4 bis 7 versetzt,

C) das Adsorberharz mit adsorbiertem Proinsulin der Formel I isoliert und

D) das Proinsulin der Formel I von Adsorberharz desorbiert;

dabei ist in Formel I und II

X

a) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder

b) ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäureresten,

Y ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest,

R<sup>1</sup> ein Phenylalaninrest oder eine kovalente Bindung,

R<sup>2</sup>

a) ein Wasserstoffatom,

b) ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest oder

c) ein Peptid mit 2 bis 45 Aminosäureresten,

R<sup>3</sup> ein genetisch kodierbarer Aminosäurerest und

die Reste A2 - A20 entsprechen der Aminosäuresequenz der A-Kette von Humaninsulin, tierischem Insulin oder einem Insulinderivat und die Reste B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der B-Kette von Humaninsulin, tierischem Insulin oder einem Insulinderivat.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Protein der Formel II eingesetzt wird, dabei ist

X ein Peptid mit der Aminosäuresequenz der C-Kette von Humaninsulin,

Y ein Aminosäurerest aus der Gruppe Ala, Thr oder Ser,

R<sup>1</sup> der Aminosäurerest Phe,

R<sup>2</sup>

a) Wasserstoffatom oder

b) ein Peptid mit 2 bis 25 Aminosäureresten,

R<sup>3</sup> ein Aminosäurerest aus der Gruppe Asn, Ser oder Gly,

und die Reste A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein Protein der Formel II eingesetzt wird, dabei ist

X ein Peptid mit 2 bis 35 Aminosäurereste, wobei am Anfang und Ende des Peptids zwei basische Aminosäurereste, insbesondere Arg und/oder Lys stehen,

Y der Aminosäurerest Thr,

R<sup>1</sup> der Aminosäurerest Phe,

R<sup>2</sup>

a) Wasserstoffatom oder

b) ein Peptid mit 2 bis 15 Aminosäureresten, an dessen Carboxylende der Aminosäurerest Met oder Arg steht,

R<sup>3</sup> der Aminosäurerest Asn,

und die Reste A2 - A20 und B2 - B29 entsprechen der Aminosäuresequenz der A- und B-Ketten von Humaninsulin.

4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Mercaptan Cystein oder Cysteinhydrochloridhydrat eingesetzt wird.

5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobes Adsorberharz ein vernetztes Polystyrol oder ein Copolymer aus Polystyrol und Divinylbenzyl eingesetzt wird.

## EP 0 600 372 A1

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Proinsulin der Formel I vom Adsorberharz mit Isopropanol desorbiert wird.

7. Proinsulin der Formel I, erhalten nach einem Verfahren, gemäß einer oder mehrerer der Ansprüche 1 bis 6.



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 93118993.0
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (in Cl.)
D, A	EP - A - 0 347 781 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) * Patentansprüche 1, 2 * ---	1-7	C 07 K 7/40 C 07 K 17/08 // A 61 K 37/26 C 07 K 99:26
D, A	WO - A - 91/03 550 (HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT) * Patentansprüche 1, 2, 15, 16 * & EP-A-0 489 780 ---	1-7	
A	CHEMICAL ABSTRACTS, Band 114, Nr. 11, 18. März 1991, Columbus, Ohio, USA ALEKSYUK, I.V. et al.: "Use of thiol sorbents for pro- duction of recombinant human proinsulin." Seite 567, Zusammenfassung- -Nr. 99 871s & Bioorg. Khim. 1990, 16(12), 1683-6 -----	1-7	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (in Cl.)
			C 07 K A 61 K C 12 N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 01-03-1994	Prüfer SCHNASS
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b>			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet		E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie		D : in der Anmeldung angeführtes Dokument	
A : technologischer Hintergrund		L : aus andern Gründen angeführtes Dokument	
O : mündliche Offenbarung			
P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze		& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**